

· 论 著 · doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2016.03.005

基于 PI3K/Akt 信号转导通路探讨电针足三里、曲池对脑缺血再灌注大鼠神经细胞凋亡的影响*

李秀坤¹, 黄英华²

(1. 四川中医药高等专科学校针推保健系, 四川绵阳 621000; 2. 四川省绵阳市中医院针灸科 621000)

[摘要] **目的** 观察电针干预对大鼠脑缺血再灌注损伤的神经保护作用, 应用磷脂酰肌醇-3 激酶/丝氨酸-苏氨酸蛋白激酶 (PI3K/Akt) 信号转导通路抑制剂 LY294002, 深入探讨电针的神经保护作用与 PI3K/Akt 信号转导通路的关系。**方法** 本研究采用 Zealanga 线栓法制备大鼠大脑中动脉闭塞 (MCAO) 缺血再灌注模型。将 60 只 SD 大鼠随机分为 5 组: 假手术 (SC) 组、模型 (IC) 组、电针 (EA) 组、电针+溶剂 (DMSO) 组、电针+抑制剂 (LY294002) 组, 每组各 12 只。术后 24 h 开始电针治疗 30 min, 1 次/天, 治疗 3 d。采用 Zealanga 5 分评价方法观察神经功能缺损恢复程度; 氯化三苯四唑 (TTC) 法脑组织染色计算脑梗死体积; TUNEL 法观察皮质区缺血周围神经细胞凋亡的情况; 应用 Western blot 检测脑组织中 PI3K、Akt、p-Akt、bad、p-bad 蛋白表达水平。**结果** 神经功能评分、TTC 染色显示 EA 组与 DMSO 组的神经功能恢复及脑缺血改善明显优于 IC 组和 LY294002 组 ($P < 0.05$); EA 组与 DMSO 组凋亡阳性细胞数少于 IC 组和 LY294002 组, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$); 与 IC 组及 LY294002 组比较, EA 组与 DMSO 组提高了 PI3K、p-Akt 及 p-bad 的蛋白表达 ($P < 0.05$)。**结论** PI3K/Akt 信号转导通路参与了电针足三里穴、曲池穴对脑缺血再灌注损伤的神经保护作用。

[关键词] 电针; 脑缺血; 再灌注损伤; PI3K/Akt; 神经保护; 凋亡

[中图分类号] R34 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2016)03-0303-04

Electro-acupuncture at points of Zusanli and Quchi exerts anti-apoptotic effect through the modulation of PI3K/Akt signalling pathway*

Li Xiukun¹, Huang Yinghua²

(1. Major of Acupuncture and Massage, Sichuan College of Traditional Chinese Medicine, Mianyang, Sichuan 621000, China;

2. Acupuncture and Moxibustion Department, Mianyang Hospital of Traditional Chinese Medicine, Mianyang, Sichuan 621000, China)

[Abstract] **Objective** To evaluate the neuroprotective effect of electro-acupuncture (EA) on cerebral ischemia-reperfusion (IR) injury and deeply investigate the relationship between this neuroprotective effect and PI3K/Akt pathway. **Methods** A total of 60 Male adult SD rats were randomly divided into five groups: sham control group (SC, $n=12$), ischemia control group, (IC group, $n=12$) electro-acupuncture group (EA group, $n=12$), EA + DMSO group (DMSO group, $n=12$) and EA + LY294002 group (LY294002 group, $n=12$). Rats in the IC group, EA group, DMSO group and LY294002 group underwent 2 h of middle cerebral artery occlusion (MCAO), followed by 72 h of reperfusion. DMSO or LY294002 was injected into the lateral ventricle at 30 min before the ischemia. Rats of the IC group, EA group, DMSO group and LY294002 group received electro-acupuncture at 24 h after the operation and continued until animals were sacrificed at 72 h after the operation, and the stimulation parameters were set as follows: disperse wave, 30 min of each time, once a day. Neurological deficit scores were assessed at 24 h, 48 h and 72 h after the IR injury. The infarct volume was determined at 72 h after the IR injury using TTC staining. Apoptotic cells in the cerebral cortex were quantified under confocal fluorescence microscope using TUNEL staining. The expression of PI3K, Akt, p-Akt, Bad and p-Bad at the protein level was assessed by Western blotting. **Results** Significant differences were observed in terms of neurological deficit scores between and among the EA group, DMSO group and other groups at 48 h and 72 h after the cerebral IR injury ($P < 0.05$). At 72 h after the cerebral IR injury, the infarct volume of the IC group and LY294002 group was significantly larger than those of the EA group and DMSO group ($P < 0.05$). Compared with the IC group and LY294002 group, EA treatment greatly reduced the number of apoptotic nerve cells ($P < 0.01$). The expression of PI3K, p-Akt and p-Bad at the protein level in the EA group and DMSO group were higher than those of the IC group and LY294002 group ($P < 0.05$). **Conclusion** EA treatment at points of Zusanli (ST36) and Quchi (LI11) exerted the neuroprotective effect on the cerebral IR injury through the modulation of PI3K/Akt pathway.

[Key words] electroacupuncture; brain ischemia; reperfusion injury; PI3K/Akt pathway; neuroprotective effect; apoptosis

脑缺血是指各种原因所致脑动脉供血障碍而引发一系列病理生理变化, 并引起相应症状和体征的一类疾病。近年来研究表明, 磷脂酰肌醇-3 激酶/丝氨酸-苏氨酸蛋白激酶 (PI3K/Akt) 途径在脑缺血再灌注损伤中能抑制神经细胞凋亡, 发挥

脑保护作用^[1]。PI3K/Akt 信号通路是细胞存活的重要信号通路。PI3K 激活后可磷酸化细胞膜上的肌醇, 产生第二信使 PIP3, PIP3 通过与 Akt 的 PH 结构域结合, 不仅促使 Akt 从细胞质到细胞膜的转位, 还可使其构象发生改变, 进而使 Akt 的

* 基金项目: 国家自然科学基金 (30600795)。 作者简介: 李秀坤 (1976—), 讲师, 硕士, 主要从事针灸康复专业教学及针灸康复治疗神经系统疾病研究。

Ser473 和 Thr308 位点磷酸化而被激活。PI3K 激活的 Akt 可以通过磷酸化作用激活或抑制其下游靶蛋白 Bad、半胱天冬氨酸蛋白酶 9 (Caspase-9)、核转录因子 kappa B (NF- κ B)、叉头转录因子 (Forkhead)、哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mTOR)、前列腺凋亡反应因子 4 (Par-4)、P21 等,从而介导多种生物学效应,如介导胰岛素、多种生长因子诱发的细胞生长,经多种途径促进细胞存活,是重要的抗凋亡调节因子^[2]。本研究基于 PI3K 特异性抑制剂 LY294002,通过大鼠脑缺血再灌注模型阐明电针“足三里”、“曲池”的抗神经细胞凋亡作用,从而阐明 PI3K/Akt 信号转导通路参与电针改善缺血性损伤的机制。

1 材料与方法

1.1 材料 (1)仪器与设备:脑立体定位仪(68000,深圳市瑞沃德生命科技有限公司);电针仪(G6805,中国上海医疗仪器厂出品);“华佗牌”不锈钢针(中国苏州医疗用品厂有限公司);高速冷冻离心机(Thermo, Fisher, 美国);切片机(Leica, 德国);激光共聚焦荧光显微镜(Bio-rad, 美国);酶标仪(Leica, 德国);电泳槽(Bio-rad, 美国);转膜仪(Bio-rad, 美国);脱色摇床(Leica, 德国);凝胶成像系统(Bio-rad, 美国);电子分析天平(Leica, 德国)。(2)试剂、耗材:氯化三苯四唑(TTC)染液(Sigma 公司, 美国);二甲基亚砜(DMSO, 厦门鹭隆生物科技发展有限公司);LY294002 (CST 公司, 美国);TUNNE 试剂盒(Promega 公司 G3250, 美国);DAPI(CST 公司, 美国);苯甲基磺酰氟(PMSF, 碧云天, 中国);十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)电泳胶(碧云天, 中国);PI3K、Akt、p-Akt、bad、p-bad 及 β -actin 一抗和碱性磷酸酶标记山羊抗兔(CST 公司, 美国)。

1.2 方法

1.2.1 实验方法

1.2.1.1 实验动物及分组 选用健康雄性 SD 大鼠 60 只,由中国上海 SLAC 实验动物有限责任公司提供[合格证号:SCXK(沪)2007-0005],于实验动物中心喂养 5 d 后,体质量达(300 \pm 20)g 进行实验研究。食物和水在整个实验过程中均由实验动物自由索取。实验经福建中医药大学动物管理制度和使用委员会批准而进行,实验过程中动物的处理均严格按照国际道德准则和国家健康指南关于维护和使用实验动物相关条例进行。将 60 只大鼠运用随机数字表法随机分为 5 组,(1)假手术(SC)组:只分离动脉,不结扎、插线,不做治疗处理。(2)模型(IC)组:制作大脑中动脉缺血再灌注大鼠模型(I/R)后,不做其他治疗。(3)电针(EA)组:造模后予电针“曲池”、“足三里”穴干预治疗。(4)电针+溶剂(DMSO)组:造模前 30 min 侧脑室注射 DMSO(溶解 LY294002 的溶剂),造模后予电针干预治疗。(5)电针+抑制剂(LY294002)组:造模前 30 min 侧脑室注射 LY294002,造模后予电针干预治疗。每组各 12 只,称质量并编号。

1.2.1.2 大鼠大脑中动脉缺血再灌注模型制备 术前所有实验动物均禁食但不禁水 12 h。将动物称质量,用 10%水合氯醛按照 0.3 mL/g 对动物进行麻醉。在室温下,参考 1989 年 Longa 的方法并加以改进,行左侧大脑中动脉闭塞(middle cerebral artery occlusion, MCAO)手术。颈前正中切开皮肤,钝性分离颈总动脉、颈内动脉、颈外动脉。结扎颈总动脉分叉处的颈外动脉,在距颈总动脉分叉约 0.5 mm 处剪一小口,将直径为 0.3 mm 的鱼线涂有石蜡的一端沿切口插入颈总动脉,缓慢推动鱼线向颈内动脉入颅脑内,直至感觉有少许阻力为止(约 18~22 mm)。缝合伤口,于缺血 2 h 后拔出栓线,形成缺血再灌注模型。SC 组只分离动脉,不结扎、插线。动物苏醒后观察

其体态及行为,以判断 MCAO 模型成功。

1.2.1.3 药物注射 二甲基亚砜[DMSO(CH_3)₂SO]是一种极性非质子溶剂。LY294002 用 DMSO 稀释成 50 mmol/L 于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存,使用前用 PBS(pH=7.2)稀释至所需浓度(10 mmol/L, 10 μL)^[3]。将 SD 大鼠麻醉后固定于脑立体定位仪,并调整参数。颅顶部备皮、消毒,于颅顶正中线偏左 3 mm 处,平行正中线切一 0.5 cm 切口,于正中线左侧旁开 1.8 mm、前囟点垂直线后方 1.0 mm 处钻一小孔,在脑立体定位仪的引导下将微量注射器针头垂直插入脑皮质,直至距离脑皮质表面深度 3.5 mm,确定针头在脑室内后,缓慢注射 LY294002 或 DMSO(10 mmol/L, 10 μL),注射完药物后缓慢退出注射器(退针时间不能短于 3 min),缝合皮肤。给药时间在造模前 30 min^[4]。

1.2.1.4 电针刺激 取 EA 组、DMSO 组、LY294002 组大鼠右侧肢体“曲池”(LI11)、“足三里”(ST36)穴(大鼠穴位定位参考《实验针灸学》中的定位方法)^[5],0.30 mm \times 25.00 mm 的针具直刺至二穴,深度为 2~3 mm。适当的提插捻转后通以电针仪装置。刺激参数:疏密波,频率 4~20 Hz,刺激强度以保持针刺局部轻轻抖动为度(电流 1~3 mA,电压 1~3 V)。大鼠在术后每隔 24 小时治疗 1 次,电针 30 min,治疗 3 d。

1.2.1.5 动物神经行为学评估 各组大鼠在术后 2 h、1 d、2 d 和 3 d 由一不了解分组情况的观察者进行神经行为学评分并记录,按 Zealanga 5 分评价方法进行神经功能缺损评估^[6],0 分:无神经功能缺损;1 分:提尾时右前肢内收,不能完全伸展;2 分:自发行走时向右侧转圈;3 分:行走时身体向右侧倾倒;4 分:不能自发行走,有意识丧失;剔除 0 分及 4 分。

1.2.2 标本采集、观察指标与测定方法

1.2.2.1 脑梗死体积测定 缺血再灌注 3 d 后将各组大鼠麻醉,经生理盐水灌洗后,于冰上迅速开颅取脑。脑组织置于 -80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存 20 min 后,用刀片自距大脑额部 2 mm 处沿冠状面将脑组织切成 2 mm 厚的薄片,每个脑组织切成 6 片薄片,将切片置于 2%的 2,3,5-TTC 中,放入避光的 37 $^{\circ}\text{C}$ 温箱 30 min,不时翻动脑片。将染色后的脑组织切片整齐的置于标尺上,用数码相机(康佳 sx20)拍照输入计算机,应用 Image-ProPlus 图像分析处理系统(Motic Med 6.0 System)计算每片脑组织脑梗死的体积(梗死体积=每个脑片梗死面积 \times 2 mm),每个脑组织梗死的总体积由连续切割的 6 片脑组织的梗死体积相加所得。最后计算出梗死总体积/整个大脑体积百分比,以此结果做统计分析。

1.2.2.2 TUNEL 染色 各组动物麻醉后相继用生理盐水、4%多聚甲醛磷酸盐缓冲液(pH 7.4)经左心室灌流后,于冰上迅速开颅取脑,分离左侧病灶处大脑皮质部的脑组织,置于冰冷的 4%多聚甲醛磷酸盐缓冲液待用。经常规石蜡包埋、切片(每片厚 5 μm)、脱蜡,根据原位细胞凋亡 TUNEL 检测试剂盒的说明对凋亡阳性细胞进行检测。激光共聚焦荧光显微镜(LSM 710 ZEISS)观察由 DAPI 染色而成蓝色荧光的细胞核和代表凋亡阳性细胞的绿色荧光。在显微镜放大(\times 400)视野下,每组任意选择 5 个视野,输入 Image-ProPlus 图像分析处理系统,计数凋亡细胞数。结果以凋亡细胞率表示:绿色荧光的凋亡细胞数/DAPI 染色总的细胞数 \times 100%。

1.2.2.3 蛋白提取及检测 (1)总蛋白提取:各组在规定时间内麻醉后断头,剥离左缺血侧皮层于液氮中,后置于 -80 $^{\circ}\text{C}$ 超低温冰箱保存。用 PMSF 提取脑组织总蛋白,并置于 -80 $^{\circ}\text{C}$ 备用。(2)Western blot:根据 DAB 方法对所提蛋白液进行浓度测定后于 100 $^{\circ}\text{C}$ 金属浴中变性。每泳道上样量为 50 μg 蛋

白。电泳(4%浓缩胶,12%分离胶,120 V,50 mA,1.5 h)结束后将凝胶取出,用聚偏氟乙烯(PVDF)膜转印,50 V,100 mA,2 h。5%脱脂奶粉液的封闭2 h,TBS清洗,分别加入稀释的抗PI3K、Akt、p-Akt、bad、p-bad 和 β -actin 抗体(1:1 000),4 $^{\circ}$ C 孵育过夜,TBS清洗,加入碱性磷酸酶标记山羊抗兔免疫球蛋白G(IgG,1:2 000)室温2 h,TBS清洗。将滤膜放于显色液中显色后显影,图像由生物分析系统(Bio-Rad 公司,Model Gel Doc 2000,美国)分析处理。

1.3 统计学处理 采用 SPSS16.0 统计软件进行处理,计量资料用 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间比较采用 t 检验和单因素方差分析对实验数据进行方差比较和组间比较统计学处理,检验水准 $\alpha=0.05$,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 实验模型制备 本实验造模成功率为 91.67%,其中 IC 组和 DMSO 组各死亡 2 只,LY294002 组死亡 1 只,剔除 IC 组行为评分 0 分 1 只及 EA 组 4 分 1 只,最终共有 55 只大鼠进入本实验。

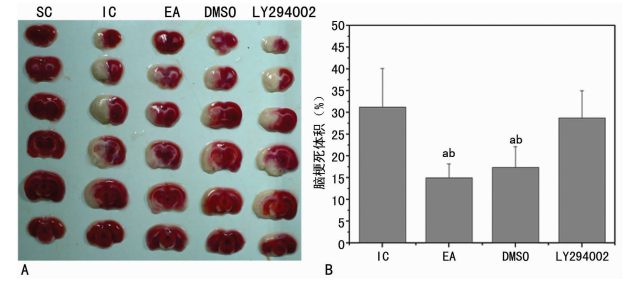
2.2 神经行为学评分 SC 组大鼠未见神经功能缺损体征,神经行为学评分为 0 分。IC 组、EA 组、DMSO 组、LY294002 组 SD 大鼠在术后 2 h 的神经行为学评估均出现不同程度的异常神经体征,组间比较差异无统计学意义,但与 SC 组比较差异有统计学意义($P<0.05$);缺血再灌注后 2、3 d,EA 组、DMSO 组的神经行为学评分分别和 IC 组、LY294002 组比较差异有统计学意义($P<0.05$);EA 组与 DMSO 组的神经功能缺损评分比较,差异无统计学意义($P>0.05$),见表 1。

表 1 各组 MCAO 模型大鼠神经行为学评分情况($\bar{x}\pm s$)					
组别	<i>n</i>	再灌注后 2 h	再灌注后 1 d	再灌注后 2 d	再灌注后 3 d
SC 组	12	0 ^c	0 ^c	0 ^c	0 ^c
IC 组	12	2.33 \pm 0.39	2.09 \pm 0.39	1.91 \pm 0.51	1.57 \pm 0.48
EA 组	12	2.29 \pm 0.40	2.04 \pm 0.42	1.45 \pm 0.32 ^{ab}	1.16 \pm 0.36 ^{ab}
DMSO 组	12	2.41 \pm 0.37	2.10 \pm 0.46	1.43 \pm 0.31 ^{ab}	1.19 \pm 0.34 ^{ab}
LY294002 组	12	2.47 \pm 0.41	2.04 \pm 0.38	1.89 \pm 0.40	1.53 \pm 0.39

^a: $P<0.05$,与 IC 组比较;^b: $P<0.05$,与 LY294002 组比较;^c: $P<0.05$,与其余 4 组比较。

2.3 脑梗死体积测定 SC 组脑组织染色为红色,其余 4 组脑组织冠状切面均可见不同程度左侧梗死灶苍白脑组织。与 IC 组比较,电针治疗极显著地减少了脑梗死体积($P<0.05$)。EA 组、DMSO 组的脑梗死体积较 LY294002 组明显较少,差异有统计学意义($P<0.05$);EA 组与 DMSO 组的脑梗死体积比

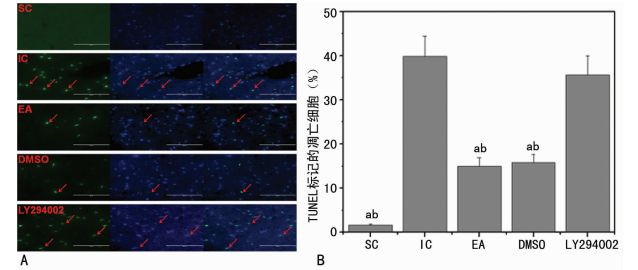
较,差异无统计学意义($P>0.05$),见图 1。



A:缺血再灌注 3 d 后,各组动物($n=3$)典型冠状面脑组织切片 TTC 染色;B:柱状图显示了术后 72 h 各组脑梗死体积的百分比。^a: $P<0.05$,与 IC 组比较;^b: $P<0.05$,与 LY294002 组比较。

图 1 各组脑组织冠状面 TTC 染色及脑梗死体积

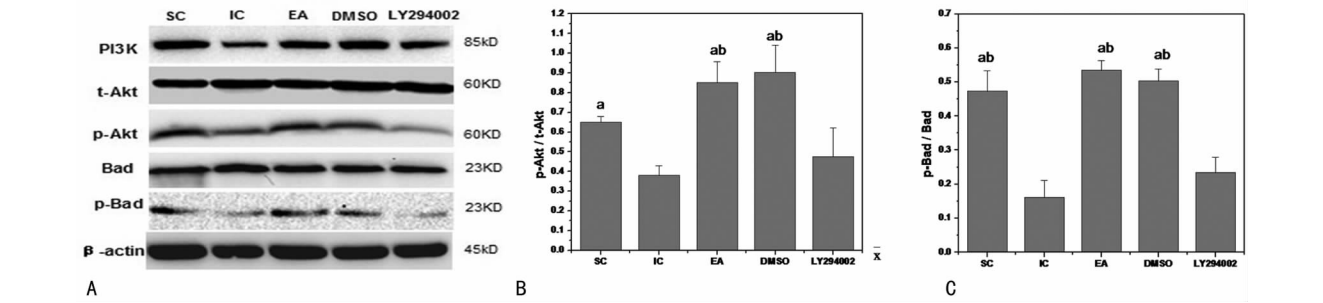
2.4 皮质区缺血周围凋亡神经细胞 图 2 显示了再灌注 3 d SC 组、IC 组、EA 组、DMSO 组、LY294002 组大鼠皮质区缺血周围神经细胞凋亡百分比分别是(1.12 \pm 0.01)%, (43.4 \pm 11.2)%, (14.1 \pm 5.2)%, (15.9 \pm 2.4)% 和 (38.7 \pm 3.7)%。与 SC 组相比,IC 组的绿色荧光的凋亡细胞明显增加,电针治疗后凋亡阳性细胞数大大减少,两组比较差异有统计学意义($P<0.01$);EA 组与 DMSO 组的凋亡阳性细胞较 LY294002 组明显较少,差异有统计学意义($P<0.01$);EA 组与 DMSO 组的凋亡阳性细胞数比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。



A:缺血再灌注 3 d 后,各组大鼠($n=4$)皮质区脑缺血周围有代表性 TUNEL 染色图($\times 400$);B:各组大鼠在缺血再灌注 3 d 后皮质区脑缺血周围凋亡细胞率(凋亡阳性细胞数/总的细胞数 $\times 100\%$)。^a: $P<0.05$,与 IC 组比较;^b: $P<0.05$,与 LY294002 组比较。

图 2 各组大鼠缺血皮层 TUNEL 染色结果

2.5 PI3K/Akt 信号通路 如图 3 所示,脑缺血再灌注 3 d 后各组 PI3K 及 p-Akt 的蛋白表达均是减少。与 IC 组、LY294002 组比较,EA 组、DMSO 组的 PI3K、p-Akt 及 p-Bad 的蛋白表达明显增多,并使 pAkt/Akt、p-bad/bad 比值均明显升高,差异有统计学意义($P<0.05$)。



A:Western blot 法检测各组($n=5$)大鼠脑缺血再灌注 3 d 后,PI3K、t-Akt、p-Akt、Bad、p-Bad 的蛋白表达水平, β -actin 可视为内部参照。B:各组大鼠磷酸化 p-Akt/t-Akt 的量化数据;C:各组大鼠磷酸化 p-Bad/Bad 的量化数据。^a: $P<0.05$,与 IC 组比较;^b: $P<0.05$,与 LY294002 组比较。

图 3 各组大鼠 PI3K、Akt、p-Akt、bad、p-bad 蛋白表达水平

3 讨 论

脑缺血再灌注后神经损伤的机制是一个复杂的多因素过程,近年来的研究进展主要集中于氧化应激反应、炎性反应、钙超载、脑水肿和细胞凋亡等方面。随着信号通路及凋亡途径的研究发展,细胞凋亡成为缺血性脑血管病研究的热点。

目前认为,细胞凋亡的启动前提是信号转导的激活,其中 PI3K/Akt 信号通路是细胞存活的重要信号通路,多种神经营养因子通过激活 PI3K/Akt 信号通路抑制细胞凋亡,发挥神经保护作用^[6]。多数研究表明,PI3K/Akt 途径在脑缺血再灌注损伤中能减少脑梗死体积,抑制神经细胞凋亡,发挥脑保护作用^[1,7];但随着脑损伤的加重,这种自我保护效应最多只能持续 24 h^[8]。Ishrat 等^[8]永久性 MCAO 大鼠模型,检测 24 h 时 IC 组的 p-Akt/Akt 比值较 SC 组明显升高,而 p-Bad/Bad 较 SC 组明显减低。Chen 等^[7]用 PI3K 配体 Pam3CSK4 诱导 PI3K/Akt 途径,发现脑缺血再灌注后 PI3K 配体组小鼠的脑梗死体积明显减小,细胞凋亡数减少,其下游 B 细胞淋巴瘤/白血病 2 蛋白(Bcl-2),B 细胞淋巴瘤/白血病 2 蛋白相关 X 蛋白(Bax)等蛋白的表达均降低,并进一步用阻断剂 LY294002 阻断该通路发现,Akt 的磷酸化水平下降,说明 PI3K/Akt 通路与脑缺血再灌注损伤中抗凋亡作用明显相关,PI3K/Akt 在脑缺血再灌注损伤中发挥着重要的神经保护作用。本研究观察缺血再灌注 72 h 大鼠,发现 IC 组的神经功能学评分、脑梗死体积、凋亡细胞数明显高于 SC 组,促凋亡因子 Bad 的表达占优势,而 PI3K、p-Akt、p-Bad 抗凋亡蛋白表达明显低于 SC 组。

针疗法系中医疗法重要组成部分,已被广泛用于中风康复治疗^[9]。研究表明电刺激可通过激活抗凋亡级联反应而减少 MCAO 模型大鼠皮层缺血区域的细胞凋亡^[10],这一过程可被 PI3K 抑制剂 LY294002 阻断,证明电刺激可通过 PI3K 通路,阻滞神经元凋亡,缩小梗死面积。有前期研究已证实电针“曲池”、“足三里”对中风患者的康复有良好的疗效,能激活运动皮质改善运动功能,有效促进急性脑缺血大鼠模型侧脑室的室管膜下区(SVZ)内源性神经干细胞增殖、迁移和分化,改善神经缺损功能^[11]。但电针“曲池”、“足三里”穴改善脑缺血再灌注损伤的具体分子机制尚未得到深入研究。本研究结果数据显示了,电针促进 p-Akt 表达,抑制了其直接下游分子 Bad 的表达,而上调的 Bad 磷酸化水平,总体上调了 pAkt/Akt、p-bad/bad 蛋白比值,从而抑制缺血再灌注后神经细胞的凋亡,以上结果与观察电针“曲池”、“足三里”对缺血再灌注损伤大鼠神经功能学评分、脑梗死体积及 TUNEL 染色的结果是一致的。

LY294002 是一种特异性的能阻断三磷酸酰肌醇蛋白激酶细胞信号传导通路的蛋白激酶抑制^[12],被广泛用于三磷酸酰肌醇蛋白激酶细胞信号传导通路的特性研究中。加入 PI3K/Akt 信号转导通路特异性抑制剂 LY294002 后,减弱电针促进抗凋亡因子 p-Akt、p-Bad 表达和电针抑制促凋亡因子 Bad 表达水平,抑制了电针改善脑缺血再灌注损伤的效应。这些结果反映了 PI3K/Akt 信号转导通路参与电针神经保护作用具有特异性。在整个实验结果中本研究均未发现 EA 组与 DMSO 组的明显差异,可见 DMSO 的加入不影响电针脑保护效应。因此,本研究结果揭示了电针“曲池”、“足三里”治疗缺血再灌注损伤的脑保护机制之一是基于 PI3K/Akt 信号转导通路实现的。

总之,本研究成功建立大鼠脑缺血再灌注模型,首次报道了加入 PI3K 抑制剂 LY294002 探讨电针“曲池”、“足三里”穴的神经保护作用与 PI3K/Akt 信号转导通路的特异性关系,为临床应用电针“曲池”、“足三里”治疗中风康复提供科学依据和理论基础。值得注意的是,电针“曲池”、“足三里”是否对脑缺血再灌注损伤抗神经细胞凋亡的脑保护作用具有长期效应及其他效应,如血管新生、神经突触重塑及神经干细胞的增殖,尚待进一步深入研究。

参考文献

- [1] Mullanokal CJ, Toledo-Pereyra LH. Akt in ischemia and reperfusion[J]. J Invest Surg, 2007, 20(3): 195-203.
- [2] Song G, Ouyang G, Bao S. The activation of Akt/PKB signaling pathway and cell survival[J]. Cell Mol Med, 2005, 9(1): 59-71.
- [3] Zhao H, Shimohata T, Wang JQ, et al. Akt contributes to neuroprotection by hypothermia against cerebral ischemia in rats[J]. J Neurosci, 2005, 25(42): 9794-9806.
- [4] Zhang L, Xing D, Chen M, et al. Leptin protects hippocampal CA1 neurons against ischemic injury[J]. Neurochem, 2008, 107(2): 578-587.
- [5] 李忠仁. 实验针灸学[M]. 北京: 中国中医药出版社, 2003: 360.
- [6] Chen B, Gao XQ, Yang CX, et al. Neuroprotective effect of grafting GDNF gene-modified neural stem cells on cerebral ischemia in rats[J]. Brain Res, 2009, 1284(1): 1-11.
- [7] Chen L, Liu L, Chen YL, et al. TLR2 ligand induces protection against cerebral ischemia/reperfusion injury via activation of phosphoinositide 3-kinase/Akt signaling[J]. Immunol, 2011, 187(3): 1458-1466.
- [8] Ishrat T, Sayeed I, Atif F, et al. Progesterone is neuroprotective against ischemic brain injury through its effects on the phosphoinositide 3-kinase/protein kinase B signaling pathway[J]. Neuroscience, 2012, 210: 442-450.
- [9] 李静. 电针治疗中风偏瘫临床研究[J]. 中医临床研究, 2011, 3(2): 10.
- [10] Baba T, Kameda M, Yasuhara T, et al. Electrical stimulation of the cerebral cortex exerts antiapoptotic, angiogenic, and anti-inflammatory effects in ischemic stroke rats through phosphoinositide 3-kinase/Akt signaling pathway[J]. Stroke, 2009, 40(11): 598-605.
- [11] Tao J, Xue XH, Chen LD, et al. Electroacupuncture improves neurological deficits and enhances proliferation and differentiation of endogenous nerve stem cells in rats with focal cerebral ischemia[J]. Neurol Res, 2010, 32(2): 98-204.
- [12] Semba S, Harada M, Yamakawa M, et al. The in vitro and in vivo effects of 2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-chromone (LY294002), a specific inhibitor of phosphatidylinositol 3'-kinase, in human colon cancer cells[J]. Clin Cancer Res, 2002, 8(6): 1957-1963.